

©Derwent Information

New oligonucleotides, useful for detecting bacteria that may contaminate drinking water, provide quick results for many species in parallel

Patent Number : WO2002102824

International patents classification : C07H-021/00 C12N-015/09 C12Q-001/68 C07H-021/04 C12Q-001/04

• Abstract :

WO2002102824 A NOVELTY - Oligonucleotides (ON) that:

- (a) have any of 47 sequences given in the specification;
- (b) are at least 80, preferably 96,% identical with (a) and hybridize specifically to nucleic acid present in bacteria that may be present in drinking water;
- (c) differ from (a) by a deletion and/or addition and have the same hybridization properties as (b); or
- (d) hybridize to sequences complementary to (a)-(c), are new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for:

- (1) detecting (M1) bacteria (A) that may be present in drinking water, using ON; and
- (2) kit for performing (M1).

USE - ON are used as probes to detect bacteria (especially Legionella, fecal streptococci and coliforms) that may contaminate drinking water in environmental samples (water or soil); clinical samples (sputum, biopsies, urine etc.); in bathing and drinking water; and in foods, pharmaceuticals and cosmetics, by in situ hybridization.

ADVANTAGE - ON combine the advantages of fluorescent in situ hybridization with those of culture methods. Only a relatively short culture step is required; analysis takes 24-48 hours (contrast many days for conventional methods), and all relevant bacteria can be tested for simultaneously. ON can differentiate between species of the same genus and are easy to use, allowing simple analysis of a large number of samples. (Dwg.0/0)

• Publication data :

Patent Family : WO2002102824 A2 20021227 DW2003-16 C07H-021/00 Ger 53p * AP:
2002WO-EP06809 20020619 DSNW: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA
CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP
KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM
PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM
ZW DSRW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ
NL OA PT SD SE SL SZ TR TZ UG ZM ZW

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (VERM-) VERMICON AG
(SKYL-) SKYLINE DISPLAYS INC
(BEIM/) BEIMFOHR C
(SNAI/) SNAIDR J
Inventor(s) : BEIMFOHR C; SNAIDR J

DE10160666 A1 20030109 DW2003-16 C07H-021/00 AP: 2001DE-1060666
20011211

EP1397518 A2 20040317 DW2004-20 C12Q-001/68 Ger FD: Based on WO2002102824 AP:
2002EP-0754712 20020619; 2002WO-EP06809 20020619 DSR: AL AT BE CH CY DE DK ES
FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI TR
AU2002321086 A1 20030102 DW2004-52 C07H-021/00 FD: Based on WO2002102824 AP:
2002AU-0321086 20020619

US2005006444 A1 20050324 DW2005-26 C12Q-001/68 AP: 2002WO-EP06809
20020619; 2003US-0742649 20031218
JP2005515756 W 20050602 DW2005-41 C12N-015/09 32p FD: Based on WO2002102824 AP:
2002WO-EP06809 20020619; 2003JP-0506296 20020619

Priority n° : 2001DE-1060666 20011211; 2001DE-1029411 20010619

Covered countries : 101

Publications count : 6

• Accession codes :

Accession N° : 2003-167479 [16]
Sec. Acc. n° CPI : C2003-043599

• Derwent codes :

Manual code : CPI: B04-B03C B04-E05 B04-F10 B04-F10A3 B11-
C07B B11-C08E B11-C08E1 B11-C08E5 B11-C09 D03-H01 D04-A04
D05-H04 D05-H08 D05-H10 D05-H12D1 D05-H18B J04-B01B
Derwent Classes : B04 D13 D15 D16 J04
Compound Numbers : RA0131-D RA0131-N

• Update codes :

Basic update code :2003-16
Equiv. update code :2003-16;
2004-20; 2004-52; 2005-26;
2005-41

Others :

Technology Abstract

TECHNOLOGY FOCUS

BIOTECHNOLOGY - Preferred Process: (M1) comprises culturing a sample that may contain (A); fixing the bacteria; then incubating fixed cells with at least one ON. Any non-hybridized ON are removed and (A) detected and visualized (optionally also quantified) from the hybridized ON. Preferably ON are labeled with a fluorophore, chemiluminescent compound, radioactive atom, enzyme, hapten or a nucleic acid detectable by hybridization, and detection uses a light or epifluorescent microscope, chemiluminometer, fluorimeter or flow cytometer. The sample is particularly drinking or surface water.

Preferred Bacteria: These are:

- (a) of the genera Legionella, especially L. pneumophila;
- (b) fecal streptococci; or
- (c) coliforms, especially Escherichia coli.

Preferred Oligonucleotides: These contain 17-25 bases. The specification lists ON that are suitable for detecting specifically the various types of bacteria listed above.

Preferred Kits: The kit contains at least one ON, optionally also hybridization, washing and fixing solutions.

Keyword Index Terms [1] 184610-0-0-0-CL; 184610-0-0-0-NEW

UP4 2003-03
UE4 2003-03; 2004-03; 2004-08; 2005-04; 2005-06

THIS PAGE BLANK (USPTO)

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 101 60 666 A 1**

51 Int. Cl.⁷:
C 07 H 21/00
C 12 Q 1/04
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 101 60 666.4
22 Anmeldetag: 11. 12. 2001
43 Offenlegungstag: 9. 1. 2003

DE 101 60 666 A 1

66 Innere Priorität:
101 29 411. 5 19. 06. 2001

71 Anmelder:
Vermicon AG, 80992 München, DE

74 Vertreter:
Maiwald Patentanwalts GmbH, 80335 München

72 Erfinder:
Beimfohr, Claudia, Dr., 80636 München, DE; Snaidr,
Jiri, Dr., 85256 Vierkirchen, DE.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis von Trinkwasser relevanten Bakterien

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien in Trink- und Oberflächenwasser, insbesondere ein Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella und der Spezies Legionella pneumophila durch in situ-Hybridisierung sowie ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von Fäkalstrep-tokokken mittels in situ-Hybridisierung sowie ein Verfah-ren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies Escherichia coli sowie entsprechende Oligonukleotidsonden und Kits, mit denen die erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt werden können.

DE 101 60 666 A 1

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien in Trink- und Oberflächenwasser, insbesondere ein Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* und der Spezies *Legionella pneumophila* durch in situ-Hybridisierung sowie ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien mittels in situ-Hybridisierung sowie ein Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies *Escherichia coli* sowie entsprechende Oligonukleotidsonden und Kits, mit denen die erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt werden können.
- [0002] Legionellen sind gram-negative, nicht sporenbildende stäbchenförmige Bakterien einer Länge von 0,5–20 µm und einem Durchmesser von 0,3–0,9 µm. Sie sind motil aufgrund ihrer polaren Begeißelung mit ein bis drei Flagellen. Legionellen sind ubiquitäre Bewohner feuchter Böden sowie aller nicht-marinen aquatischen Habitate. Ideale Bedingungen für ihre Vermehrung bestehen bei Temperaturen zwischen 25°C und 55°C. Folglich finden sie sich auch in vom Menschen geschaffenen entsprechenden Lebensräumen, wie z. B. Warm- und Kaltwasseranlagen, Kühltürmen von Klimaanlage und Wasserverdunstern. Als intrazelluläre Parasiten von Amöben und Ciliaten können sie auch ungünstige Lebensbedingungen wie z. B. extreme Temperaturen und Chlorung von Wasser überleben.
- [0003] Legionellen sind Krankheitserreger; sie verursachen beim Menschen eine akute bakterielle Pneumonie mit fatalen Verlauf, die allgemein unter dem Namen "Legionärskrankheit" bekannt ist. Dieser Name stammt von der Untersuchung einer auffälligen Häufung von Pneumoniefällen (189 Erkrankungen mit 29 Todesfällen) unter den etwa 3000 Delegierten des jährlichen Treffens der "Pennsylvania Division of the American Legion" im Juli 1976. Die Untersuchung führte zur Isolierung eines bis dahin unbekannten Bakteriums, *L. pneumophila* (McDade et al., 1977. *Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease*. N. Engl. J. Med. 297(22): 1197–203), das einer neuen Familie, den Legionellaceae, zugeordnet wurde (Brenner, D. J. 1979, *Speciation in Yersinia*, S. 33–43. In: Carter, P.B., Lafleur, L. und Toma, S. (Hrsg.), *Contributions to microbiology and immunology*, Vol. 5. Karger, Basel, Switzerland). Als weitere Form der durch Legionellen ausgelösten Erkrankung ist inzwischen das sogenannte Pontiac Fieber bekannt, welches durch grippeähnliche Symptome gekennzeichnet und nicht mit einer Pneumonie verbunden ist. Die Gründe dafür, dass Patienten die eine oder andere Erkrankungsform entwickeln, sind nicht bekannt.
- [0004] Die Lebensbedrohlichkeit einer durch Legionellen ausgelösten Erkrankung sowie die Fähigkeit der Legionellen, auch unter ungünstigen Lebensbedingungen lange Zeit zu überdauern, belegen die Notwendigkeit eines schnellen und zuverlässigen Nachweisverfahrens.
- [0005] Der traditionelle Nachweis von Legionellen mittels Kultivierung ist ein äußerst aufwendiges Verfahren, welches erst durch mehrere aufeinanderfolgende Kultivierungsschritte auf verschiedenen Medien innerhalb von sieben bis 14 Tagen zu einem Ergebnis führt.
- [0006] Trotz des hohen damit verbundenen Aufwandes ist die Kultivierung bis heute das Mittel der Wahl zum Nachweis von Legionellen, da verschiedene alternative Verfahren die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllen konnten.
- [0007] So ist die Analyse verdächtiger Proben anhand biochemischer Parameter, wie der Ermittlung von Quinon-Profilen mittels HPLC oder der Fettsäurezusammensetzung mittels GLC-MS (z. B. Ehret et al., 1987, *Zentrabl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]*, 266 (1–2), 261–75) für die Routine-Diagnose aufgrund des sehr hohen Geräte- und Zeitaufwandes ungeeignet. Außerdem stellt die sachgerechte Durchführung dieser Analysen höchste Anforderungen an die Qualifikation des ausführenden Personals.
- [0008] Die direkte Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (DFA; direct fluorescent antibody staining) liefert Ergebnisse zwar bereits innerhalb weniger Stunden, die Methode ist aber weder ausreichend sensitiv noch ausreichend spezifisch. Nur zwischen 25% und 70% der mittels Kultivierung positiv getesteten Proben waren auch mittels DFA positiv (Zuravleff, J.L., V.L. Yu, J.L. Shonnard, 1983. *Diagnosis of Legionnaires' disease and update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture*. JAMA, Vol. 250, S. 1981–1985; Buesching, W. J., R.A. Brust, L. W. Ayers, 1983. *Enhanced primary isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens by low pH treatment*. J. Clin. Microbiol., Vol. 17, S. 153–1155; Edelstein, P.H., 1987. *The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease*. Sem. Respir. Infect., Vol. 2, S. 235–241.). Darüber hinaus sind zahlreiche Spezies bekannt, die durch Legionella DFA-Konjugate fälschlicherweise ebenfalls angefärbt werden, z. B. *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* und *P. putida* sowie verschiedene Bacteroides Species. Dies führt zwangsläufig immer wieder zu falsch positiven Ergebnissen. Außerdem problematisch bei diesem Testverfahren, ebenso wie bei allen anderen auf Antikörperbindung beruhenden Verfahren (z. B. RIA, ELISA, IFA), ist außerdem die immense Vielzahl unterschiedlicher Legionella-Serotypen. Die große Zahl der zur Detektion aller Serotypen somit erforderlichen Antisera ist kaum mehr zu handhaben, andererseits ist, bei Beschränkung auf einige wenige Antisera, die Aussagekraft eines negativen Testergebnisses unvermeidbar gering.
- [0009] Auf *Escherichia coli* und coliforme Bakterien, als sogenannte Markerorganismen, wird bei zahlreichen mikrobiologischen Analysen untersucht. Während beispielsweise bei der Untersuchung von Lebensmitteln, Trink- und Oberflächenwasser *E. coli*, als sogenannter Indexorganismus, eine potentielle Gesundheitsgefährdung anzeigt, gelten coliforme Bakterien als Indikatoren für eine generell unzureichende Hygiene. Die Untersuchung mikrobiologischer Proben auf Index- und Indikatororganismen ermöglicht es auf die aufwendige Untersuchung derselben Proben auf eine Vielzahl von Krankheitserregern zu verzichten, da die Anwesenheit dieser Bakterien sehr wahrscheinlich.
- [0010] Die coliformen Bakterien stellen eine äußerst heterogene Bakteriengruppe dar. Zur Gruppe der Coliformen gehören die Genera *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* und *Citrobacter*. Die Zugehörigkeit von Bakterien zu dieser Gruppe ist somit nicht durch taxonomische Merkmale definiert, sondern durch das Verhalten der Bakterien in entsprechenden Nachweisverfahren. Insofern werden den Coliformen alle gram-negativen, aeroben, fakultativ anaeroben, Stäbchen zugeordnet, welche Laktose unter Gas- und Säurebildung innerhalb von 48 Stunden bei Temperaturen zwischen 30°C und 37°C fermentieren. Coliforme, die unter höheren Temperaturen, nämlich bei 44°C bis 45,5°C Laktose zu fermentieren vermögen, werden auch als Fäkal-Coliforme, thermotrophe Coliforme oder präsuntive *E. coli* bezeichnet.

- [0011] Während der Sinn des Coliformen-Nachweises inzwischen durchaus umstritten ist (Means, E. G., Olson, B.H., 1981. Coliforms inhibition by bacteriocin-like substances in drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 42, S. 506–512; Burlingame, G.A.; McElhaney, J.; Pipes, W.O., 1984. Bacterial interference with coliform colony sheen production on membrane filters. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 47, S. 56–60; Schmidt-Lörenz et al., 1988, Kritische Überlegungen zum Aussagewert von *E. coli*, Coliformen und Enterobacteriaceen in Lebensmitteln, Arch. Lebensmittelhyg. 39, 3–15.) steht der Wert des Nachweises von *E. coli* als Markerorganismus außer Frage. 5
- [0012] Darüber hinaus dient *E. coli* keineswegs nur als Indexbakterium in mikrobiologischen Analysen, sondern es sind eine Reihe pathogener Stämme dieses Organismus bekannt. Diese enterovirulenten Stämme werden in verschiedenen Subgruppen (Enterotoxinbildner, Enteropathogene, Enterohämorrhagische, Enteroinvasive, Enteroadhärenzte *E. coli*) eingeteilt. Alle Bakterien dieser Subgruppen lösen Durchfallerkrankungen unterschiedlicher Schweregrade bis hin zur Lebensbedrohlichkeit aus. 10
- [0013] Standardmäßig erfolgt der Nachweis von *E. coli* und Coliformen mittels Kultivierung, die durch mehrere aufeinanderfolgende Kultivierungsschritte auf verschiedenen Medien innerhalb von zwei bis vier Tagen zu einem Ergebnis führt. Als alternatives Kultivierungsverfahren bringt die Kultivierung auf Fluorocult LMX-Bouillon bereits nach 30 Stunden ein Ergebnis. Auch das Membranfilterverfahren zum Nachweis von *E. coli* (der Nachweis von Coliformen ist so nicht möglich) benötigt immer noch 22 bis 32 Stunden bis zum Ergebnis. Hierbei kommt es jedoch nicht selten zu falsch positiven Ergebnissen, da gerade bei Frischfleisch nicht selten Indol-positive *Klebsella oxytoca* und *Providencia*-Arten vorkommen. 15
- [0014] Als weitere Indikatoren für Fäkalkontaminationen von Trink- und Oberflächenwasser gelten die sogenannten Fäkalstreptokokken. Ähnlich wie die Coliformen sind auch diese eine uneinheitliche Gruppe. Fäkalstreptokokken werden welche phylogenetisch den Gattungen *Streptococcus* und *Enterococcus* zugeordnet. Es handelt sich um Gram-positive Bakterien, welche typischerweise Diplokokken oder kurze Ketten bilden, und im Intestinaltrakt von Warmblütern verbreitet sind. 20
- [0015] In der im Jahre 2001 gültigen Deutschen Verordnung für Trinkwasser und Wasser für Lebensmittelbetriebe ist auch ein Grenzwert für Fäkalstreptokokken festgelegt. In 100 ml Trinkwasser dürfen keine Fäkalstreptokokken nachweisbar sein, andernfalls hat das untersuchte Wasser keine Trinkwasserqualität mehr. 25
- [0016] Die in der Trinkwasserverordnung empfohlenen Nachweisverfahren basieren auf direkter Kultivierung der Wasserprobe oder auf Membranfiltration und anschließendem Einbringen des Filters in 50 ml Azid-Glucose-Bouillon. Die Kultivierung soll für mindestens 24 h, bei negativem Ergebnis für 48 h, bei 36°C erfolgen. Ist auch nach 48 h keine Trübung oder Sedimentbildung der Bouillon feststellbar, gilt die Abwesenheit von Fäkalstreptokokken in der untersuchten Probe als belegt. Im Falle einer Trübung oder Sedimentbildung erfolgt ein Ausstrich der Kultur auf Enterokokken-Selektivagar nach Slanetz-Barthley und die erneute Inkubation bei 36°C für 24 h. Im Falle der Bildung rotbrauner bzw. rosafarbener Kolonien werden diese genauer untersucht. Nach Überführung in ein geeignetes Flüssigmedium und Kultivierung für 24 h bei 36°C, gelten Fäkalstreptokokken als nachgewiesen, wenn eine Vermehrung in Nährbouillon bei pH 9,6 erfolgt und Vermehrung in 6,5% NaCl-Bouillon möglich ist sowie bei Äsculinabbau. Der Äsculinabbau wird durch Zugabe von frisch hergestellter 7%iger wässriger Lösung von Eisen(II)-chlorid zur Äsculinbouillon geprüft. Bei Abbau entsteht eine braun-schwarze Farbe. Häufig wird zusätzlich eine Gramfärbung zur Unterscheidung der Bakterien von Gram-negativen Kokken durchgeführt sowie ein Katalasetest zur Unterscheidung von Staphylokokken durchgeführt. Fäkalstreptokokken reagieren Gram-positiv und Katalase-negativ. Der traditionelle Nachweis stellt sich somit als langwieriges (48–100 h) und im Verdachtfall überaus aufwendiges Verfahren dar. 30
- [0017] Als logische Konsequenz aus den Schwierigkeiten, welche die oben genannten Verfahren beim Nachweis von Legionellen, *E. coli* und Coliformen sowie Fäkalstreptokokken haben, bieten sich daher Nachweisverfahren auf Nukleinsäurebasis an. 35
- [0018] Bei der PCR, der Polymerase-Kettenreaktion wird mit spezifischen Primern ein charakteristisches Stück des jeweiligen Bakteriengenoms amplifiziert. Findet der Primer seine Zielstelle, so kommt es zu einer millionenfachen Vermehrung eines Stücks der Erbsubstanz. Bei der anschließenden Analyse, z. B. mittels eines DNA-Fragmente auftrennenden Agarose-Gels kann eine qualitative Bewertung stattfinden. Im einfachsten Fall führt dies zu der Aussage, dass die Zielstellen für die verwendeten Primer in der untersuchten Probe vorhanden waren. Weitere Aussagen sind nicht möglich; diese Zielstellen können sowohl von einem lebenden Bakterium, als auch von einem toten Bakterium oder von nackter DNA stammen. Eine Differenzierung ist hier nicht möglich. Dies ist insbesondere bei der Untersuchung von Proben auf ubiquitäre Keime wie *E. coli* und Coliforme problematisch. Da die PCR-Reaktion auch bei Anwesenheit eines toten Bakteriums oder nackter DNA positiv ausfällt, kommt es hier häufig zu falsch positiven Ergebnissen. Eine Weiterführung dieser Technik stellt die quantitative PCR dar, bei der versucht wird, eine Korrelation zwischen Menge an vorhandenen Bakterien und der Menge an amplifizierter DNA herzustellen. Vorteile der PCR liegen in ihrer hohen Spezifität, leichten Anwendbarkeit und im geringen Zeitaufwand. Wesentliche Nachteile sind ihre hohe Anfälligkeit für Kontaminationen und damit falsch positive Ergebnisse sowie die bereits erwähnte fehlende Möglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen bzw. nackter DNA zu unterscheiden. 40
- [0019] Einen einzigartigen Ansatz, die Spezifität der molekularbiologischen Methoden wie der PCR mit der Möglichkeit der Bakterienvisualisierung, wie sie die Antikörper-Methoden ermöglichen, zu verbinden, bietet die Methode der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH; Amann, R.L., W. Ludwig und K.-H. Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbial. Rev. 59, S. 143–169). Hierbei können Bakterienarten, -gattungen oder -gruppen hochspezifisch identifiziert und visualisiert werden. 45
- [0020] Die FISH-Technik basiert auf der Tatsache, dass es in Bakterienzellen bestimmte Moleküle gibt, die aufgrund ihrer lebenswichtigen Funktion im Laufe der Evolution nur wenig mutiert wurden: Die 16S und die 23S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA). Beide sind Bestandteile der Ribosomen, den Orten der Proteinbiosynthese, und können aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung, ihrer Größe, und ihrer strukturellen und funktionellen Konstanz als spezifische Marker dienen (Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51, S. 221–271). Ausgehend von einer vergleichenden Sequenzanalyse können phylogenetische Beziehungen allein aufgrund dieser Daten aufgestellt werden. Dazu müssen 50

diese Sequenzdaten in ein Alignment gebracht werden. Im Alignment, welches sich auf Kenntnisse über die Sekundärstruktur und Tertiärstruktur dieser Makromoleküle stützt, werden die homologen Positionen der ribosomalen Nukleinsäuren in Einklang miteinander gebracht.

[0021] Ausgehend von diesen Daten können phylogenetische Berechnungen durchgeführt werden. Der Einsatz modernster Computertechnologie macht es möglich, auch großangelegte Berechnungen schnell und effektiv auszuführen, sowie große Datenbanken, welche die Alignment-Sequenzen der 16S-rRNA und 23S-rRNA beinhalten, anzulegen. Durch den schnellen Zugriff auf dieses Datenmaterial können neu erhaltene Sequenzen in kurzer Zeit phylogenetisch analysiert werden. Diese rRNA Datenbanken können dazu verwendet werden, art- und gattungsspezifische Gensonden zu konstruieren. Hierbei werden alle verfügbaren rRNA Sequenzen miteinander verglichen und für bestimmte Sequenzstellen Sonden entworfen, die spezifisch eine Bakterienart, -gattung oder -gruppe erfassen.

[0022] Bei der FISH (Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung)-Technik werden diese Gensonden, die zu einer bestimmten Region auf der ribosomalen Zielsequenz komplementär sind, in die Zelle geschleust. Die Gensonden sind i. d. R. kleine, 16-20 Basen lange, einzelsträngige Desoxyribonukleinsäurestücke und richten sich gegen eine Zielregion, welche typisch für eine Bakterienart oder eine Bakteriengruppe ist. Findet die fluoreszenzmarkierte Gensonde in einer Bakterienzelle ihre Zielsequenz, so bindet sie daran und die Zellen können aufgrund ihrer Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

[0023] Die FISH-Analyse wird grundsätzlich auf einem Objektträger durchgeführt, da bei der Auswertung die Bakterien durch Bestrahlung mit einem hochenergetischen Licht visualisiert, also sichtbar gemacht werden. Hierin liegt allerdings einer der Nachteile der klassischen FISH-Analyse: da auf einem Objektträger naturgemäß nur relative kleine Volumina analysiert werden können, kann die Sensitivität der Methode unbefriedigend und für eine verlässliche Analyse nicht ausreichend sein. Mit der vorliegenden Erfindung werden daher die Vorteile der klassischen FISH-Analyse mit denen der Kultivierung verknüpft. Durch einen vergleichsweise kurzen Kultivierungsschritt wird sichergestellt, dass die nachzuweisenden Bakterien in ausreichender Zahl vorliegen, bevor der Nachweis der Bakterien mittels spezifischer FISH durchgeführt wird.

[0024] Die Durchführung der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella sowie der Spezies *L. pneumophila* oder zum spezifischen Nachweis von Fäkalstreptokokken oder zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies *E. coli* umfasst somit die folgenden Schritte:

- Kultivierung der in der untersuchten Probe enthaltenen Bakterien
- Fixierung der in der Probe enthaltenen Bakterien
- Inkubation der fixierten Bakterien mit Nukleinsäuresondenmolekülen, um eine Hybridisierung herbeizuführen,
- Entfernen bzw. Abwaschen der nicht hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle und
- Detektieren der mit den Nukleinsäuresondenmolekülen hybridisierten Bakterien.

[0025] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter "Kultivieren" die Vermehrung der in der Probe enthaltenen Bakterien in einem geeigneten Kultivierungsmedium verstanden. Die hierzu geeigneten Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt.

[0026] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter "Fixieren" der Bakterien eine Behandlung verstanden, mit der die Bakterienhülle für Nukleinsäuresonden durchlässig gemacht wird. Zur Fixierung wird üblicherweise Ethanol verwendet. Kann die Zellwand mit diesen Maßnahmen nicht von den Nukleinsäuresonden penetriert werden, so sind dem Fachmann ausreichend weitere Maßnahmen bekannt, die zu demselben Ergebnis führen. Dazu zählen beispielsweise Methanol, Mischungen von Alkoholen, eine niederprozentige Paraformaldehydlösung oder eine verdünnte Formaldehydlösung, enzymatische Behandlungen oder ähnliches.

[0027] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden für die "Hybridisierung" die fixierten Bakterien mit fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuresonden inkubiert. Diese Nukleinsäuresonden, die aus einem Oligonukleotid und einem daran gebundenen Marker bestehen, können dann die Zellhülle penetrieren und sich an die der Nukleinsäuresonde entsprechenden Zielsequenz im Zellinneren binden. Die Bindung ist als Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Nukleinsäurestücken zu verstehen.

[0028] Die Nukleinsäuresonde kann dabei komplementär zu einer chromosomalen oder episomalen DNA sein, aber auch zu einer mRNA oder rRNA des nachzuweisenden Mikroorganismus. Von Vorteil ist es, eine Nukleinsäuresonde zu wählen, die zu einem Bereich komplementär ist, der in einer Kopiezahl von mehr als 1 im nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Die nachzuweisende Sequenz liegt bevorzugt 500-100.000 mal pro Zelle vor, besonders bevorzugt 1.000-50.000 mal. Aus diesem Grunde wird bevorzugt die rRNA als Zielstelle verwendet, da die Ribosomen in der Zelle als Orte der Proteinbiosynthese vieltausendfach in jeder aktiven Zelle vorliegen.

[0029] Bei der Nukleinsäuresonde im Sinne der Erfindung kann es sich um eine DNA- oder RNA-Sonde handeln, die in der Regel zwischen 12 und 1000 Nukleotide, bevorzugt zwischen 12 und 500, bevorzugter zwischen 12 und 200, besonders bevorzugt zwischen 12 und 50 und zwischen 15 und 40, und am meisten bevorzugt zwischen 17 und 25 Nukleotide umfassen wird. Die Auswahl der Nukleinsäuresonden geschieht nach den Gesichtspunkten, ob eine komplementäre Sequenz in dem nachzuweisenden Mikroorganismus vorliegt. Durch diese Auswahl einer definierten Sequenz, kann durch eine Bakterienart, eine Bakteriengattung oder eine ganze Bakteriengruppe erfasst werden. Komplementarität sollte bei einer Sonde von 15 Nukleotiden über 100% der Sequenz gegeben sein. Bei Oligonukleotiden mit mehr als 15 Nukleotiden sind ein bis mehrere Fehlpaarungsstellen erlaubt. Durch das Einhalten von stringenten Hybridisierungsbedingungen wird gewährleistet, dass das Nukleinsäuremolekül auch tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Wie im folgenden noch erläutert, bedeuten stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung bspw. 20-80% Formamid im Hybridisierungspuffer.

[0030] Im Rahmen der erfindungsgemäßen Verfahren haben die erfindungsgemäßen Nukleinsondenmoleküle die folgenden Längen und Sequenzen.

DE 101 60 666 A 1

[0031] Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* und der Spezies *L. pneumophila*:

5'- cac tac cct ctc cca tac

5

5'- cac tac cct ctc cta tac

5'- c cac cac cct ctc cca tac

10

5'- c cac ttc cct ctc cca tac

15

5'- c cac tac cct ctc ccg tac

20

5'- c cac tac cct cta cca tac

25

5'- t atc tga ccg tcc cag gtt a

[0032] Verfahren zum spezifischen Nachweis von Fäkalstreptokokken:

5'- ccc tct gat ggg tag gtt

30

5'- ccc tct gat ggg cag gtt

35

5'- tag gtg ttg tta gca ttt cg

40

5'- cac tcc tct ttt tcc ggt

5'-c cac ttc tct ttt tcc ggt

45

5'- c cac tct tct ttt tcc ggt

50

5'- c cac tct tct ttt ccc ggt

55

5'-cac aca atc gta aca tcc ta

5'- agg gat gaa ctt tcc act c

60

5'- cca ctc att ttc ttc cgg

65

5'-ccc ccg ctt gag ggc agg

5 5'- cct ctt ttc ccg gtg gag

10 5'- cct ctt ttt ccg gtg gag c

15 5'- cac tcc tct ttt cca atg a

5'- cac tcc tct tac ttg gtg

20 5'- tag gtg cca gtc aaa ttt tg

25 5'- ccc ctt ctg atg ggc agg

5'- ccc cct ctg atg ggc agg

30 5'- cga ctt cgc aac tcg ttg

35 5'- cga ctt cgc gac tcg ttg

40 5'- cga gtt cgc aac tcg ttg

[0033] Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies
Escherichia coli:

45

50

55

60

65

5' gac ccc ctt gcc gaa a

5' atg acc ccc tag ccg aaa

5' - ggc aca acc tcc aag tcg ac

5' - gga caa cca gcc tac atg ct

5' - aca aga ctc cag cct gcc

5' - cag gcg gtc tat tta acg cgt t

5' - ggc aca acc tcc aaa tcg ac

5' - ggc cac aac ctc caa gta ga

5' - acc aca ctc cag cct gcc

5' - aca aga ctc tag cct gcc

5' - ggc ggt cga ttt aac gcg tt

5' - ggc ggt cta ctt aac gcg tt

5' - ggc ggt cta ttt aat gcg tt

5' - agc tcc gga agc cac tcc tca

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5'- gga aca acc tcc aag tcg

5'- gcc aca acc tcc aag tag

5'- atg gcc ccc tag ccg aaa

5'- g atg acc ccc tag ccg aaa

5'- aac ctt gcg gcc gta ctc cc

[0034] Gegenstand der Erfindung sind auch Abwandlungen der obigen Oligonukleotidsequenzen, die trotz der Abweichungen in der Sequenz und/oder Länge eine spezifische Hybridisierung mit Ziel-Nukleinsäuresequenzen des jeweiligen Bakteriums zeigen und somit für den Einsatz in einem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind. Hierunter fallen insbesondere

- a) Nukleinsäuremoleküle, die (i) mit einer der obigen Oligonukleotidsequenzen (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 47) in mindestens 60%, 65%, bevorzugt in mindestens 70%, 75%, bevorzugter in mindestens 80%, 84%, 87% und besonders bevorzugt in mindestens 90%, 94%, 96% der Basen übereinstimmen (wobei der Sequenzbereich des Nukleinsäuremoleküls zu betrachten ist, der dem Sequenzbereich eines der oben angegebenen Oligonukleotide (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 47) entspricht, und nicht etwa die gesamte Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls, das u. U. im Vergleich zu den oben angegebenen Oligonukleotiden (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 47) um eine bis zahlreiche Basen verlängert ist) oder (ii) sich von obigen Oligonukleotidsequenzen (SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 47) durch eine oder mehr Deletionen und/oder Additionen unterscheiden und die eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Bakterien der Gattung *Legionella* und der Spezies *L. pneumophila*, von Fäkalstreptokokken oder von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies *Escherichia coli* ermöglichen. Dabei bedeutet "spezifische Hybridisierung", dass unter den hier beschriebenen oder den dem Durchschnittsfachmann im Zusammenhang mit in situ-Hybridisierungstechniken bekannten Hybridisierungsbedingungen nur die ribosomale RNA der Ziel-Organismen, nicht aber die rRNA von Nicht-Ziel-Organismen an das Oligonukleotid bindet.
- b) Nukleinsäuremoleküle, die mit den unter a) genannten Nukleinsäuremolekülen oder einer der Sonden SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 47 komplementär sind oder mit diesen unter stringenten Bedingungen spezifisch hybridisieren.
- c) Nukleinsäuremoleküle, die eine Oligonukleotidsequenz von SEQ a No. 1 bis SEQ ID No. 47 oder die Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls nach a) oder b) umfassen und zusätzlich zu den genannten Sequenzen bzw. deren Abwandlungen nach a) oder b) mindestens ein weiteres Nukleotid aufweisen, und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von Ziel-Organismen ermöglichen.

[0035] Der Grad der Sequenzidentität eines Nukleinsäuremoleküls mit den Sonden SEQ ID No. 1 bis SEQ ID No. 47 kann mit üblichen Algorithmen bestimmt werden. Geeignet ist hier beispielsweise das Programm zur Bestimmung der Sequenzidentität, das unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (auf diese Seite z. B. der Link "Standard nucleotide BLAST [blastn]") zugänglich ist.

[0036] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresondenmoleküle können im Rahmen des Nachweisverfahrens mit verschiedenen Hybridisierungslösungen eingesetzt werden. Verschiedene organische Lösungsmittel können hierbei in Konzentrationen von 0–80% eingesetzt werden. Durch das Einhalten von stringenten Hybridisierungsbedingungen wird gewährleistet, dass das Nukleinsäuresondenmolekül auch tatsächlich mit der Zielsequenz hybridisiert. Moderate Bedingungen im Sinne der Erfindung sind z. B. 0% Formamid in einem Hybridisierungspuffer wie er nachfolgend beschrieben ist. Stringente Bedingungen im Sinne der Erfindung sind beispielsweise 20–80% Formamid im Hybridisierungspuffer.

[0037] Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* und der Spezies *L. pneumophila* enthält eine typische Hybridisierungslösung 0%–80% Formamid, bevorzugt 20%–60% Formamid, besonders bevorzugt 35% Formamid. Sie hat außerdem eine Salzkonzentration von 0,1 mol/l–1,5 mol/l, bevorzugt von 0,5 mol/l–1,0 mol/l, bevorzugter von 0,7 mol/l–0,9 mol/l, besonders bevorzugt von 0,9 mol/l, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfasst die Hybridisierungslösung üblicherweise ein Detergens, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001%–0,2%, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,005–0,05%, bevorzugter von 0,01–0,03%, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%. Zum Puffern der Hybridisierungslösung können verschiedene Verbindungen wie Tris-HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES verwendet werden, die üblicherweise Konzentrationen von 0,01–0,1 mol/l eingesetzt werden, bevorzugt von 0,01 bis 0,08 mol/l, in einem pH-Wert-Bereich von 6,0–9,0, bevorzugt 7,0 bis 8,0. Die besonders bevorzugte erfindungsgemäße Ausführung der Hybridisierungslösung beinhaltet 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 8,0.

[0038] Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zum spezifischen Nachweis von Fäkalstreptokokken enthält eine typische Hybridisierungslösung 0%–80% Formamid, bevorzugt 20%–60% Formamid, besonders bevorzugt 35%

Formamid. Sie hat außerdem eine Salzkonzentration von 0,1 mol/l–1,5 mol/l, bevorzugt von 0,5 mol/l–1,0 mol/l, bevorzugt von 0,7 mol/l–0,9 mol/l, besonders bevorzugt von 0,9 mol/l, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfasst die Hybridisierungslösung üblicherweise ein Detergens, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001%–0,2%, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,005–0,05%, bevorzugter 0,01–0,03%, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%. Zum Puffern der Hybridisierungslösung können verschiedene Verbindungen wie Tris-HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES verwendet werden, die üblicherweise Konzentrationen von 0,01–0,1 mol/l eingesetzt werden, bevorzugt von 0,01 bis 0,08 mol/l, in einem pH-Wert-Bereich von 6,0–9,0, bevorzugt 7,0 bis 8,0. Die besonders bevorzugte erfindungsgemäße Ausführung der Hybridisierungslösung beinhaltet 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 8,0.

[0039] Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und der Spezies *E. coli* enthält eine typische Hybridisierungslösung 0%–80% Formamid, bevorzugt 20%–60% Formamid, besonders bevorzugt 50% Formamid. Sie hat außerdem eine Salzkonzentration von 0,1 mol/l–1,5 mol/l, bevorzugt von 0,7 mol/l–0,9 mol/l, besonders bevorzugt von 0,9 mol/l, wobei es sich bei dem Salz vorzugsweise um Natriumchlorid handelt. Weiter umfasst die Hybridisierungslösung üblicherweise ein Detergens, wie z. B. Natriumdodecylsulfat (SDS), in einer Konzentration von 0,001%–0,2%, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,005–0,05%, bevorzugter 0,01–0,03%, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 0,01%. Zum Puffern der Hybridisierungslösung können verschiedene Verbindungen wie Tris-HCl, Natrium-Citrat, PIPES oder HEPES verwendet werden, die üblicherweise Konzentrationen von 0,01–0,1 mol/l eingesetzt werden, bevorzugt von 0,01 bis 0,08 mol/l, in einem pH-Wert-Bereich von 6,0–9,0, bevorzugt 7,0 bis 8,0. Die besonders bevorzugte erfindungsgemäße Ausführung der Hybridisierungslösung beinhaltet 0,02 mol/l Tris-HCl, pH 8,0.

[0040] Es versteht sich, dass der Fachmann die angegebenen Konzentrationen der Bestandteile des Hybridisierungspuffer derart auswählen kann, dass die gewünschte Stringenz der Hybridisierungsreaktion erzielt wird. Besonders bevorzugte Ausführungsformen geben stringente bis besonders stringente Hybridisierungsbedingungen wieder. Unter Einsatz dieser stringenten Bedingungen kann der Fachmann feststellen, ob ein bestimmtes Nukleinsäuremolekül einen spezifischen Nachweis von Nukleinsäuresequenzen von Ziel-Organismen ermöglicht und somit im Rahmen der Erfindung zuverlässig eingesetzt werden kann.

[0041] Die Konzentration der Sonde, kann je nach Markierung und Anzahl der zu erwartenden Zielstruktur stark schwanken. Um eine schnelle und effiziente Hybridisierung zu ermöglichen, sollte die Sondenmenge die Anzahl der Zielstrukturen um mehrere Größenordnungen überschreiten. Allerdings ist bei der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung (FISH) darauf zu achten, dass eine zu hohe Menge an fluoreszenzmarkierter Hybridisierungssonde zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führt. Die Menge an Sonde sollte deshalb in einem Bereich zwischen 0,5 ng/μl und 500 ng/μl, bevorzugt zwischen 1,0 ng/μl und 100 ng/μl und besonders bevorzugt bei 1,0–50 ng/μl liegen.

[0042] Das verwendete Volumen der Hybridisierungslösung sollte zwischen 8 μl und 100 ml liegen, bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren beträgt es 40 μl.

[0043] Die Dauer der Hybridisierung beträgt üblicherweise zwischen 10 Minuten und 12 Stunden; bevorzugt erfolgt die Hybridisierung für etwa 1,5 Stunden. Die Hybridisierungstemperatur beträgt bevorzugt zwischen 44°C und 48°C, besonders bevorzugt 46°C, wobei der Parameter der Hybridisierungstemperatur, wie auch die Konzentration an Salzen und Detergenzien in der Hybridisierungslösung in Abhängigkeit von den Nukleinsäuresonden, insbesondere deren Längen und dem Grad der Komplementarität zur Zielsequenz in der nachzuweisenden Zelle optimiert werden kann. Der Fachmann ist mit hier einschlägigen Berechnungen vertraut.

[0044] Nach erfolgter Hybridisierung sollten die nicht hybridisierten und überschüssigen Nukleinsäuresondenmoleküle entfernt bzw. abgewaschen werden, was üblicherweise mittels einer herkömmlichen Waschlösung erfolgt. Diese Waschlösung kann, falls gewünscht, 0,001–0,1% eines Detergens wie SDS, wobei eine Konzentration von 0,01% bevorzugt wird, sowie Tris-HCl in einer Konzentration von 0,001–0,1 mol/l, bevorzugt 0,01–0,05 mol/l, besonders bevorzugt 0,02 mol/l, enthalten, wobei der pH-Wert von Tris-HCl im Bereich von 6,0 bis 9,0, vorzugsweise bei 7,0 bis 8,0, besonders bevorzugt bei 8,0 liegt. Ein Detergens kann enthalten sein, ist aber nicht zwingend erforderlich. Weiter enthält die Waschlösung üblicherweise NaCl, wobei die Konzentration je nach benötigter Stringenz von 0,003 mol/l bis 0,9 mol/l, bevorzugt von 0,01 mol/l bis 0,9 mol/l, beträgt. Besonders bevorzugt ist eine NaCl-Konzentration von 0,07 mol/l (Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* der Spezies *L. pneumophila*) bzw. von 0,07 mol/l (Verfahren zum spezifischen Nachweis von Fäkalstreptokokken) bzw. von 0,018 mol/l (Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies *E. coli*). Des Weiteren kann die Waschlösung EDTA in einer Konzentration bis zu 0,01 mol/l enthalten, wobei die Konzentration vorzugsweise 0,005 mol/l beträgt. Ferner kann die Waschlösung auch dem Fachmann geläufige Konservierungsmittel in geeigneten Mengen enthalten.

[0045] Allgemein kommen bei dem Waschschriff Pufferlösungen zum Einsatz, die prinzipiell sehr ähnlich aussehen können, wie Hybridisierungspuffer (gepufferte Natriumchloridlösung), nur dass der Waschschriff in einem Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration, bzw. bei höherer Temperatur durchgeführt wird.

[0046] Zur theoretischen Abschätzung der Hybridisierungsbedingungen kann folgende Formel verwendet werden:

$$T_d = 81,5 + 16,6 \lg[\text{Na}^+] + 0,4 \times (\% \text{ GC}) - 820/n - 0,5 \times (\% \text{ FA})$$

T_d = Dissoziationstemperatur in °C

$[\text{Na}^+]$ = Molarität der Natriumionen

% GC = Anteil der Guanin- und Cytosinnukleotide an der Anzahl der Basen

n = Länge des Hybrids

% FA = Formamidgehalt

[0047] Mit Hilfe dieser Formel kann z. B. der Formamidanteil (der wegen der Toxizität des Formamids möglichst gering sein sollte) des Waschpuffers ersetzt werden durch einen entsprechend niedrigeren Natriumchloridgehalt. Allerdings

ist dem Fachmann aus der umfangreichen Literatur zu in situ-Hybridisierungsmethoden bekannt, dass und auf welche Weise die genannten Bestandteile variiert werden können. Bezüglich der Stringenz der Hybridisierungsbedingungen gilt das oben im Zusammenhang mit dem Hybridisierungspuffer Gesagte.

- [0048] Das "Abwaschen" der nicht gebundenen Nukleinsäuresondenmoleküle erfolgt üblicherweise bei einer Temperatur im Bereich von 44°C bis 52°C, bevorzugt von 44°C bis 50°C und besonders bevorzugt bei 46°C für eine Dauer von 10–40 Minuten, vorzugsweise für 15 Minuten.

- [0049] In einer alternativen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresondenmoleküle im sogenannten Fast-FISH-Verfahren zum spezifischen Nachweis der angegebenen Ziel-Organismen eingesetzt. Das Fast-FISH-Verfahren ist dem Fachmann bekannt und z. B. in der deutschen Patentanmeldung DE 199 36 875.9 und der internationalen Anmeldung WO 99/18234 beschrieben. Auf die in diesen Dokumenten enthaltene Offenbarung zur Durchführung der dort beschriebenen Nachweisverfahren wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

- [0050] Die spezifisch hybridisierten Nukleinsäuresondenmoleküle können anschließend in den jeweiligen Zellen detektiert werden. Voraussetzung hierfür ist, dass das Nukleinsäuresondenmolekül nachweisbar ist, z. B. dadurch dass das Nukleinsäuresondenmolekül durch kovalente Bindung mit einem Marker verknüpft ist. Als detektierbare Marker werden z. B. fluoreszierende Gruppen wie z. B. CY2 (erhältlich von Amersham Life Sciences, Inc., Arlington Heights, USA), CY3 (ebenfalls erhältlich von Amersham Life Sciences), CY5 (ebenfalls zu beziehen von Amersham Life Sciences), FITC (Molecular Probes Inc., Eugene, USA), FLUOS (erhältlich von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), TRITC (erhältlich von Molecular Probes Inc. Eugene, USA), 6-FAM oder FLUOS-PRIME verwendet, die dem Fachmann alle wohl bekannt sind. Auch chemische Marker, radioaktive Marker oder enzymatische Marker wie Meerrettich-Peroxidase, saure Phosphatase, alkalische Phosphatase, Peroxidase, können verwendet werden. Für jedes dieser Enzyme ist eine Reihe von Chromogenen bekannt, die anstelle des natürlichen Substrates umgesetzt werden können, und entweder zu farbigen oder zu fluoreszierenden Produkten umgesetzt werden können. Beispiele für solche Chromogene sind in der nachfolgenden Tabelle angegeben:

25

Tabelle

Enzyme

1. Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase

30

2. Peroxidase

35

3. Meerrettichperoxidase

40

4. β -D-Galaktosidase

5. Glukoseoxidase

Chromogen

4-Methylumbelliferylphosphat (Fluoreszenz), Bis(4-Methylumbelliferylphosphat), (Fluoreszenz) 3-O-Methylfluoreszein, Flavon-3-Diphosphatdiammoniumsalz (Fluoreszenz), p-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz

Tyraminhydrochlorid (Fluoreszenz), 3-(p-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (Fluoreszenz), p-Hydroxyphenethylalkohol (Fluoreszenz), 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (ABTS), ortho-Phenylendiamindihydrochlorid, o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, p-Uresol (Fluoreszenz), 3,3'-dimethoxybenzidin, 3-Methyl-2-benzothiazolinhydrazon, Tetramethylbenzidin

H₂O₂ + Diammoniumbenzidin

H₂O₂ + Tetramethylbenzidin

o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, 4-Methylumbelliferyl- β -D-galaktosid

ABTS, Glukose und Thiazolylblau

45

- [0051] Schließlich ist es möglich, die Nukleinsäuresondenmoleküle so zu gestalten, dass an ihrem 5'- oder 3'-Ende eine weitere zur Hybridisierung geeignete Nukleinsäuresequenz vorhanden ist.

- [0052] Diese Nukleinsäuresequenz umfasst wiederum ca. 15 bis 1.000, bevorzugt 15–50 Nukleotide. Dieser zweite Nukleinsäurebereich kann wiederum von einem Nukleinsäuresondenmolekül erkannt werden, welches durch eines der oben erwähnten Mittel nachweisbar ist.

- [0053] Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kopplung der nachweisbaren Nukleinsäuresondenmoleküle mit einem Hapten, das anschließend mit einem das Hapten erkennenden Antikörper in Kontakt gebracht werden kann. Als Beispiel für solch ein Hapten kann Digoxigenin angeführt werden. Dem Fachmann sind über die angegebenen Beispiele auch noch weitere wohl bekannt.

- [0054] Die abschließende Auswertung ist abhängig von der Art der Markierung der verwendeten Sonde möglich mit einem Lichtmikroskop, Epifluoreszenzmikroskop, Chemoluminometer, Fluorometer u. a.

- [0055] Ein wichtiger Vorteil der in dieser Anmeldung beschriebenen Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella und der Spezies L. pneumophila oder zum spezifischen Nachweis von Fäkalstreptokokken oder Verfahren zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies E. coli gegenüber den weiter oben beschriebenen Nachweismethoden ist die Schnelligkeit. Im Vergleich zu herkömmlichen Kultivierungsverfahren, die sieben bis 14 Tage für den Nachweis von Legionellen, 48 bis 100 Stunden für den Nachweis von Fäkalstreptokokken bzw. 30 bis 96 Stunden für den Nachweis von coliformen Bakterien und E. coli benötigen, liegt das Ergebnis bei Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren innerhalb von 24–48 Stunden vor.

- [0056] Ein weiterer Vorteil liegt im gleichzeitigen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella und der Spezies Legionella pneumophila. Mit bislang geläufigen Verfahren können lediglich Bakterien der Spezies Legionella pneumophila mit mehr oder weniger großer Zuverlässigkeit nachgewiesen werden. Epidemiologische Untersuchungen haben aber gezeigt, dass neben Legionella pneumophila auch andere Spezies der Gattung Legionella die gefährliche Legionärskrankheit auslösen können, z. B. Legionella micdadei. Der alleinige Nachweis von Legionella pneumophila muss daher nach

- 65

dem heutigen Kenntnisstand als nicht länger ausreichend angesehen werden.

[0057] Ein weiterer Vorteil liegt in der Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen Bakterien der Gattung *Legionella* und denen der Spezies *Legionella pneumophila*. Diese ist durch die Verwendung unterschiedlich markierter Nukleinsäuresondenmoleküle leicht und zuverlässig möglich.

[0058] Ein weiterer Vorteil liegt in der Spezifität dieser Verfahren. Durch die verwendeten Nukleinsäuresondenmoleküle können sowohl spezifisch sämtliche Arten der Gattung *Legionella*, aber auch hochspezifisch nur die Spezies *L. pneumophila* nachgewiesen und visualisiert werden. Ebenso zuverlässig werden sämtliche Arten der heterogenen Gruppen der Fäkalstreptokokken und der Coliformen nachgewiesen sowie sämtliche Subgruppen der Spezies *E. coli*. Durch die Visualisierung der Bakterien kann eine gleichzeitige visuelle Kontrolle stattfinden. Falsch positive Ergebnisse sind somit ausgeschlossen.

[0059] Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemäßen Verfahren liegt in der leichten Handhabbarkeit. So können durch die Verfahren leicht große Mengen an Proben auf das Vorhandensein der genannten Bakterien getestet werden.

[0060] Die erfindungsgemäßen Verfahren können vielfältig angewendet werden.

[0061] So können beispielsweise Umweltproben auf das Vorhandensein von Legionellen untersucht werden. Diese Proben können hierzu z. B. aus Wasser oder aus dem Boden entnommen sein. Das erfindungsgemäße Verfahren kann weiter zur Untersuchung medizinischer Proben eingesetzt werden. Es ist u. a. für die Untersuchung von Proben aus Sputum, Bronchoalveolärer Lavage oder endotrachealer Absaugung geeignet. Es ist des weiteren für die Untersuchung von Gewebeproben, z. B. Biopsiematerial aus der Lunge, Tumor- oder entzündlichem Gewebe, aus Sekreten wie Schweiß, Speichel, Sperma und Ausfluß aus der Nase, Harnröhre oder Vagina sowie für Urin- oder Stuhlproben geeignet.

[0062] Ein weiteres Anwendungsgebiet für das vorliegende Verfahren ist die Untersuchung von Wässern, z. B. Dusch- und Badewässern oder Trinkwasser.

[0063] Ein weiteres Anwendungsgebiet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Kontrolle von Lebensmitteln. In bevorzugten Ausführungsformen werden die Lebensmittelproben aus Milch oder Milchprodukten (Joghurt, Käse, Quark, Butter, Buttermilch), Trinkwasser, Getränken (Limonaden, Bier, Säfte), Backwaren oder Fleischwaren entnommen.

[0064] Ein weiteres Anwendungsgebiet für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Untersuchung pharmazeutischer und kosmetischer Produkte, z. B. Salben, Cremes, Tinkturen, Säfte, Lösungen, Tropfen etc. ist mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich.

[0065] Erfindungsgemäß werden weiterhin drei Kits zur Durchführung der entsprechenden Verfahren zur Verfügung gestellt. Die in diesen Kits enthaltene Hybridisierungsanordnung ist z. B. in der deutschen Patentanmeldung 100 61 655.0 beschrieben. Auf die in diesem Dokument enthaltene Offenbarung bezüglich der in situ-Hybridisierungsanordnung wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

[0066] Außer der beschriebenen Hybridisierungsanordnung (als VIT-Reaktor bezeichnet) umfassen die Kits als wichtigsten Bestandteil die jeweilige Hybridisierungslösung mit den weiter oben beschriebenen für die nachzuweisenden Mikroorganismen spezifischen Nukleinsäuresondenmolekülen (als VIT-Lösung bezeichnet). Weiterhin ist jeweils enthalten der entsprechende Hybridisierungspuffer (Solution C) und ein Konzentrat der entsprechenden Waschlösung (Solution D). Weiterhin sind enthalten gegebenenfalls Fixierungslösungen (Solution A und Solution B) sowie gegebenenfalls eine Einbettlösung (Finisher). Finisher sind im Handel erhältlich, sie verhindern u. a. das rasche Ausbleichen fluoreszierender Sonden unter dem Fluoreszenzmikroskop. Gegebenenfalls sind Lösungen zur parallelen Durchführung einer Positivkontrolle (Positive Control) sowie einer Negativkontrolle (Negative Control) enthalten.

[0067] Das folgende Beispiel soll die Erfindung erläutern, ohne sie einzuschränken:

Beispiel

Spezifischer Schnellnachweis trinkwasserrelevanter Bakterien in einer Probe

[0068] Eine Probe wird in geeigneter Weise 20–44 h kultiviert. Verschiedene hierzu geeignete Verfahren sind dem Fachmann wohlbekannt. Zu einem Aliquot dieser Kultur wird dasselbe Volumen Fixierungslösung (Solution A, 50% Ethanol) zugegeben.

[0069] Zur Durchführung der Hybridisierung wird ein geeignetes Aliquot der fixierten Zellen (bevorzugt 40 µl) auf einen Objektträger aufgebracht und getrocknet (46°C, 30 min oder bis vollständig trocken). Anschließend werden die getrockneten Zellen vollständig dehydratisiert durch Zusatz einer weiteren Fixierungslösung (Solution B, Ethanol absolut, bevorzugt 40 µl). Der Objektträger wird erneut getrocknet (Raumtemperatur, 3 min oder bis vollständig trocken).

[0070] Anschließend wird auf die fixierten, dehydratisierten Zellen die Hybridisierungslösung (VIT-Lösung) mit den weiter oben beschriebenen für die nachzuweisenden Mikroorganismen spezifischen Nukleinsäuresondenmolekülen aufgebracht. Das bevorzugte Volumen beträgt 40 µl. Der Objektträger wird anschließend in einer mit Hybridisierungspuffer (Solution C, entspricht der Hybridisierungslösung ohne Sondenmoleküle) befeuchteten Kammer, bevorzugt dem VIT-Reaktor, inkubiert (46°C, 90 min).

[0071] Anschließend wird der Objektträger aus der Kammer entnommen, die Kammer mit Waschlösung befüllt (Solution D, 1 : 10 verdünnt in destilliertem Wasser) und der Objektträger in dieser inkubiert (46°C, 15 min).

[0072] Anschließend wird die Kammer mit destilliertem Wasser befüllt, der Objektträger kurz eingetaucht und anschließend in seitlicher Stellung luftgetrocknet (46°C, 30 min oder bis vollständig trocken).

[0073] Anschließend wird der Objektträger in einem geeigneten Medium (Finisher) eingebettet.

[0074] Abschließend wird die Probe mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert.

Organization Applicant

 5 Street : Dachauerstr. 148
 City : 80992 München
 State :
 Country :
 10 PostalCode :
 PhoneNumber :
 FaxNumber :
 15 EmailAddress :
 <110> OrganizationName : Vermicon AG

20 Application Project

 <120> Title : Verfahren zum spezifischen Schnellnachweis von Trinkwasser
 25 <130> AppFileReference : V7378
 <140> CurrentAppNumber : DE 101 60 666.4
 <141> CurrentFilingDate : 2001-06-19

30

Sequenz

 35 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz
 <400> PreSequenzString :
 cactaccctc tcccatac
 40 <212> Typ : DNA
 <211> Länge : 18
 Sequenz-Name : seq001
 45 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

18

Custom Codon

 50 Sequenz Name : seq001

Sequenz

 55 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz
 <400> PreSequenzString :
 60 cactaccctc tcctatac
 <212> Typ : DNA
 <211> Länge : 18
 65 Sequenz-Name : seq002
 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

18

Custom Codon

Sequenz Name : seq002

5

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

10

<400> PreSequenzString :

ccaccaccct ctcccatac

19

<212> Typ : DNA

15

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : SEQ003

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

20

Custom Codon

Sequenz Name : SEQ003

25

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

30

<400> PreSequenzString :

ccacttcct ctcccatac

19

<212> Typ : DNA

35

<211> Länge : 19

40

Sequenz-Name : SEQ004

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

Sequenz Name : SEQ004

50

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

55

<400> PreSequenzString :

ccactaccct ctcccgtac

19

<212> Typ : DNA

60

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : SEQ005

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

65

Custom Codon

5 Sequenz Name : SEQ005

Sequenz

10 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenzString :

19

ccactaccct ctaccatac

15 <212> Typ : DNA

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : SEQ006

20 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

25 -----

Sequenz Name : SEQ006

30 Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

35 <400> PreSequenzString :

20

tatctgaccg tcccagggtta

<212> Typ : DNA

40 <211> Länge : 20

Sequenz-Name : seq007

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

50 Sequenz Name : seq007

Sequenz

55 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenzString :

18

ccctctgatg ggtaggtt

60 <212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq008

65 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

Sequenz Name : seq008

5

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

10

<400> PreSequenzString :

ccctctgatg ggcaggtt

18

15

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq009

20

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

Sequenz Name : seq009

25

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

30

<400> PreSequenzString :

taggtgttgt tagcatttcg

20

35

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 20

40

Sequenz-Name : seq010

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

Sequenz Name : seq010

50

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

55

<400> PreSequenzString :

cactcctctt tttccggt

18

60

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq011

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

65

Custom Codon

5 Sequenz Name : seq011

Sequenz

10 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenzString :

ccacttctct ttttccggt

19

15 <212> Typ : DNA

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : seq012

20 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

25 -----

Sequenz Name : seq012

30 Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

35 <400> PreSequenzString :

ccactcttct ttttccggt

19

<212> Typ : DNA

40 <211> Länge : 19

Sequenz-Name : seq013

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

50 Sequenz Name : seq013

Sequenz

55 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenzString :

ccactcttct tttcccggt

19

60 <212> Typ : DNA

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : seq014

65 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

Sequenz Name : seq014

5

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

10

<400> PreSequenzString :

cacacaatcg taacatccta

20

<212> Typ : DNA

15

<211> Länge : 20

Sequenz-Name : seq015

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

20

Custom Codon

Sequenz Name : seq015

25

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

30

<400> PreSequenzString :

agggatgaac tttccactc

19

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 19

40

Sequenz-Name : seq016

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

Sequenz Name : seq016

50

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

55

<400> PreSequenzString :

ccactcattt tcttccgg

18

<212> Typ : DNA

60

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq017

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

65

Custom Codon

5 Sequenz Name : seq017

Sequenz

10

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenzString :

cccccgcttg agggcagg

18

15

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq018

20

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

25

Sequenz Name : seq018

30

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

35

<400> PreSequenzString :

cctcttttcc cgggtggag

18

<212> Typ : DNA

40

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq019

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

Sequenz Name : seq019

50

Sequenz

55

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenzString :

cctcttttttc cgggtggagc

19

60

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : seq020

65

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

Sequenz Name : seq020

5

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

10

<400> PreSequenzString :

cactcctctt ttccaatga

19

15

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 19

Sequenz-Name : seq021

20

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

Sequenz Name : seq021

25

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

30

<400> PreSequenzString :

cactcctctt acttggtg

18

35

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

40

Sequenz-Name : seq022

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

Sequenz Name : seq022

50

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

55

<400> PreSequenzString :

taggtgccag tcaaattttg

20

60

<212> Typ : DNA

<211> Länge : 20

Sequenz-Name : seq023

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

65

Custom Codon

5 Sequenz Name : seq023

Sequenz

10 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

18

<400> PreSequenzString :

ccccttctga tgggcagg

15 <212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq024

20 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

25 Sequenz Name : seq024

30 Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

18

35 <400> PreSequenzString :

ccccctctga tgggcagg

<212> Typ : DNA

40 <211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq025

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45 Custom Codon

50 Sequenz Name : seq025

Sequenz

55 <213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

18

<400> PreSequenzString :

cgacttcgca actcgcttg

60 <212> Typ : DNA

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq026

65 Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon

Sequenz Name : seq026

5

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

10

<400> PreSequenzString :

cgacttcgcg actcgttg

18

<212> Typ : DNA

15

<211> Länge : 18

Sequenz-Name : seq027

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

20

Custom Codon

Sequenz Name : seq027

25

Sequenz

<213> Name des Organismus : Künstliche DNA-Sequenz

30

<400> PreSequenzString :

cgagttcgca actcgttg

18

<212> Typ : DNA

35

<211> Länge : 18

40

Sequenz-Name : seq028

Sequenz-Beschreibung : Oligonukleotid

45

Custom Codon

Sequenz Name : seq028

50

Sequence

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

55

<400> PreSequenceString :

gacccccttg ccgaaa

16

<212> Type : DNA

60

<211> Length : 16

SequenceName : 29

65

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

5 Custom Codon

Sequence Name : 29

10

Sequence

15 <213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenceString :

18

atgaccccct agccgaaa

<212> Type : DNA

20

<211> Length : 18

SequenceName : 30

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

25

Custom Codon

30 Sequence Name : 30

Sequence

35 -----

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenceString :

20

40 ggcacaacct ccaagtcgac

<212> Type : DNA

<211> Length : 20

SequenceName : 31

45

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

50 Custom Codon

Sequence Name : 31

55

Sequence

60 <213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenceString :

20

ggacaaccag cctacatgct

<212> Type : DNA

65 <211> Length : 20

SequenceName : 32

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon		5

Sequence Name : 32		
		10
Sequence		

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz		15
<400> PreSequenceString :		
acaagactcc agcctgcc	18	
<212> Type : DNA		20
<211> Length : 18		
SequenceName : 33		
Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid		25
Custom Codon		

Sequence Name : 33		30
Sequence		35

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz		
<400> PreSequenceString :		
caggcggtct atttaacgcg tt	22	40
<212> Type : DNA		
<211> Length : 22		
SequenceName : 34		45
Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid		
Custom Codon		50

Sequence Name : 34		
		55
Sequence		

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz		60
<400> PreSequenceString :		
ggcacaacct ccaaatcgac	20	
<212> Type : DNA		
<211> Length : 20		65
SequenceName : 35		

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

5 Custom Codon

Sequence Name : 35

10

Sequence

15 <213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenceString :

ggccacaacc tccaagtaga

20

<212> Type : DNA

20

<211> Length : 20

SequenceName : 36

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

25

Custom Codon

30

Sequence Name : 36

Sequence

35

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

<400> PreSequenceString :

40 accacactcc agcctgcc

18

<212> Type : DNA

<211> Length : 18

45

SequenceName : 37

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

50 Custom Codon

Sequence Name : 37

55

Sequence

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

60

<400> PreSequenceString :

acaagactct agcctgcc

18

<212> Type : DNA

65

<211> Length : 18

SequenceName : 38

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon		5

Sequence Name : 38		
		10
Sequence		

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz		15
<400> PreSequenceString :		
ggcggtcgat ttaacgcgtt	20	
<212> Type : DNA		20
<211> Length : 20		
SequenceName : 39		
Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid		25
Custom Codon		

Sequence Name : 39		30
Sequence		
-----		35
<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz		
<400> PreSequenceString :		
ggcgggtctac ttaacgcgtt	20	40
<212> Type : DNA		
<211> Length : 20		
SequenceName : 40		45
Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid		
Custom Codon		50

Sequence Name : 40		
		55
Sequence		

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz		60
<400> PreSequenceString :		
ggcgggtctat ttaatgcgtt	20	
<212> Type : DNA		
<211> Length : 20		65
SequenceName : 41		

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

5 Custom Codon

Sequence Name : 41

10

Sequence

15 <213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

21

<400> PreSequenceString :

agctccggaa gccactcctc a

20 <212> Type : DNA

<211> Length : 21

SequenceName : 42

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

25

Custom Codon

30 Sequence Name : 42

Sequence

35 -----

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

18

<400> PreSequenceString :

40 ggaacaacct ccaagtcg

<212> Type : DNA

<211> Length : 18

SequenceName : 43

45

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

50 Custom Codon

Sequence Name : 43

55

Sequence

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz

18

60 <400> PreSequenceString :

gccacaacct ccaagtag

<212> Type : DNA

65 <211> Length : 18

SequenceName : 44

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

Custom Codon	5

Sequence Name : 44	
	10
Sequence	

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz	15
<400> PreSequenceString :	
atggccccct agccgaaa	18
<212> Type : DNA	20
<211> Length : 18	
SequenceName : 45	
Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid	25
Custom Codon	

Sequence Name : 45	30
Sequence	
-----	35
<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz	
<400> PreSequenceString :	
gatgaccccc tagccgaaa	19 40
<212> Type : DNA	
<211> Length : 19	
SequenceName : 46	45
Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid	
Custom Codon	50

Sequence Name : 46	
	55
Sequence	

<213> Name des Organismus : künstliche DNA-Sequenz	
<400> PreSequenceString :	60
aaccttgccg ccgtactccc	20
<212> Type : DNA	
<211> Length : 20	65
SequenceName : 47	

Sequenzbeschreibung : Oligonukleotid

5 Custom Codon

Sequence Name : 47

10

Patentansprüche

1. Oligonukleotid, das eine Nukleotidsequenz ausweist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus (sämtliche in 5'→3'-Richtung)

15

(i) 5'- cac tac cct ctc cca tac

5'- cac tac cct ctc cta tac

20

5'- c cac cac cct ctc cca tac

5'- c cac ttc cct ctc cca tac

5'- c cac tac cct ctc ccg tac

25

5'- c cac tac cct cta cca tac

5'- t atc tga ccg tcc cag gtt a

5'- ccc tct gat ggg tag gtt

30

5'- ccc tct gat ggg cag gtt

5'- tag gtg ttg tta gca ttt cg

35

5'- cac tcc tct ttt tcc ggt

5'-c cac ttc tct ttt tcc ggt

5'- c cac tct tct ttt tcc ggt

40

5'- c cac tct tct ttt ccc ggt

5'-cac aca atc gta aca tcc ta

45

5'- agg gat gaa ctt tcc act c

5'- cca ctc att ttc ttc cgg

5'-ccc ccg ctt gag ggc agg

50

5'- cct ctt ttc ccg gtg gag

5'- cct ctt ttt ccg gtg gag c

5'- cac tcc tct ttt cca atg a

55

5'- cac tcc tct tac ttg gtg

5'- tag gtg cca gtc aaa ttt tg

60

65

- 5'- ccc ctt ctg atg ggc agg
5'- ccc cct ctg atg ggc agg
5'- cga ctt cgc aac tcg ttg
5'- cga ctt cgc gac tcg ttg
5'- cga gtt cgc aac tcg ttg
5' gac ccc ctt gcc gaa a
5' atg acc ccc tag ccg aaa
5'- ggc aca acc tcc aag tcg ac
5'- gga caa cca gcc tac atg ct
5'- aca aga ctc cag cct gcc
5'- cag gcg gtc tat tta acg cgt t
5'- ggc aca acc tcc aaa tcg ac
5'- ggc cac aac ctc caa gta ga
5'- acc aca ctc cag cct gcc
5'- aca aga ctc tag cct gcc
5'- ggc ggt cga ttt aac gcg tt
5'- ggc ggt cta ctt aac gcg tt
5'- ggc ggt cta ttt aat gcg tt
5'- agc tcc gga agc cac tcc tca
5'- gga aca acc tcc aag tcg
5'- gcc aca acc tcc aag tag
5'- atg gcc ccc tag ccg aaa
5'- g atg acc ccc tag ccg aaa
5'- aac ctt gcg gcc gta ctc cc,
- ii) Oligonukleotiden, die mit den obigen Oligonukleotiden unter i) in mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80% und besonders bevorzugt mindestens 90, 92, 94, 96%, übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen,
iii) Oligonukleotiden, die sich von den Oligonukleotiden unter i) durch eine Deletion und/oder Addition unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen, und
iv) Oligonukleotiden, die mit den vorgenannten Oligonukleotiden unter i), ii) und iii) unter stringenten Bedingungen hybridisieren.
2. Verfahren zum Nachweis von trinkwasserrelevanten Bakterien in einer Probe, umfassend die Schritte
a) Kultivieren der in der Probe enthaltenen trinkwasserrelevanten Bakterien,
b) Fixieren der in der Probe enthaltenen trinkwasserrelevanten Bakterien,
c) Inkubieren der fixierten Bakterien mit mindestens einem Oligonukleotid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
i. den Oligonukleotiden nach Anspruch 1,
ii. Oligonukleotiden, die mit den Oligonukleotiden nach Anspruch 1 in mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80% und besonders bevorzugt mindestens 90, 92, 94, 96%, übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen,

- iii. Oligonukleotiden, die sich von den Oligonukleotiden nach Anspruch 1 durch eine Deletion und/oder Addition unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen, und
iv. Oligonukleotiden, die mit den vorgenannten Oligonukleotiden unter stringenten Bedingungen hybridisieren,

um eine Hybridisierung herbeizuführen,

d) Entfernen nicht hybridisierter Oligonukleotide,

e) Detektieren und Visualisieren sowie gegebenenfalls Quantifizieren der trinkwasserrelevanten Bakterienzellen mit den hybridisierten Oligonukleotiden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Oligonukleotid mit einem detektierbaren Marker, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus

a) Fluoreszenzmarker,

b) Chemolumineszenzmarker,

c) radioaktive Marker,

d) enzymatisch aktive Gruppen,

e) Hapten,

f) durch Hybridisierung nachweisbare Nukleinsäuren

gekoppelt ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die Probe eine Trinkwasser- oder Oberflächenwasserprobe ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei das Detektieren mittels Lichtmikroskop, Epifluoreszenzmikroskop, Chemoluminometer, Fluorometer Durchflusszytometer erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei es sich bei den trinkwasserrelevanten Bakterien um Bakterien der Gattung Legionella und der Spezies L. pneumophila oder um Fäkalstreptokokken oder um coliforme Bakterien und Bakterien der Spezies E. coli handelt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6 zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella und der Spezies L. pneumophila, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

5'- cac tac cct ctc cca tac

5'- cac tac cct ctc cta tac

5'- c cac cac cct ctc cca tac

5'- c cac ttc cct ctc cca tac

5'- c cac tac cct ctc ccg tac

5'- c cac tac cct cta cca tac

5'- t atc tga ccg tcc cag gtt a.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6 zum spezifischen Nachweis von Fäkalstreptokokken, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

5'-ccc tct gat ggg tag gtt	
5'-ccc tct gat ggg cag gtt	
5'-tag gtg ttg tta gca ttt cg	5
5'-cac tcc tct ttt tcc ggt	
5'-c cac ttc tct ttt tcc ggt	10
5'-c cac tct tct ttt tcc ggt	
5'-c cac tct tct ttt ccc ggt	
5'-cac aca atc gta aca tcc ta	15
5'-agg gat gaa ctt tcc act c	
5'-cca ctc att ttc ttc cgg	20
5'-ccc ccg ctt gag ggc agg	
5'-cct ctt ttc ccg gtg gag	
5'-cct ctt ttt ccg gtg gag c	25
5'-cac tcc tct ttt cca atg a	
5'-cac tcc tct tac ttg gtg	
5'-tag gtg cca gtc aaa ttt tg	30
5'-ccc ctt ctg atg ggc agg	
5'-ccc cct ctg atg ggc agg	35
5'-cga ctt cgc aac tcg ttg	
5'-cga ctt cgc gac tcg ttg	
5'-cga gtt cgc aac tcg ttg.	40
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6 zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies <i>Escherichia coli</i> , wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus	45
	50
	55
	60
	65

5' gac ccc ctt gcc gaa a

5' atg acc ccc tag ccg aaa

5' - ggc aca acc tcc aag tcg ac

5' - gga caa cca gcc tac atg ct

5' - aca aga ctc cag cct gcc

5' - cag gcg gtc tat tta acg cgt t

5' - ggc aca acc tcc aaa tcg ac

5' - ggc cac aac ctc caa gta ga

5' - acc aca ctc cag cct gcc

5' - aca aga ctc tag cct gcc

5' - ggc ggt cga ttt aac gcg tt

5' - ggc ggt cta ctt aac gcg tt

5' - ggc ggt cta ttt aat gcg tt

5' - agc tcc gga agc cac tcc tca

5' - gga aca acc tcc aag tcg

5' - gcc aca acc tcc aag tag

5' - atg gcc ccc tag ccg aaa

5' - g atg acc ccc tag ccg aaa

5' - aac ctt gcg gcc gta ctc cc

10. Verwendung eines Oligonukleotids, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus,

- i. den Oligonukleotiden nach Anspruch 1,
- ii. Oligonukleotiden, die mit den Oligonukleotiden nach Anspruch 1 in mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80% und besonders bevorzugt mindestens 90, 92, 94, 96%, übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen,
- iii. Oligonukleotiden, die sich von den Oligonukleotiden nach Anspruch 1 durch eine Deletion und/oder Addition unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen, und
- iv. Oligonukleotiden, die mit den vorgenannten Oligonukleotiden unter stringenten Bedingungen hybridisieren, zum Nachweis von trinkwasserrelevanten Bakterien in einer Probe.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

5' - cac tac cct ctc cca tac

5' - cac tac cct ctc cta tac

5' - c cac cac cct ctc cca tac

5' - c cac ttc cct ctc cca tac

5' - c cac tac cct ctc ccg tac

5' - c cac tac cct cta cca tac

5' - t atc tga ccg tcc cag gtt a

und das Oligonukleotid zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* und der Spezies *L. pneumophila* dient.

12. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

5'-ccc tct gat ggg tag gtt	
5'-ccc tct gat ggg cag gtt	
5'-tag gtg ttg tta gca ttt cg	5
5'-cac tcc tct ttt tcc ggt	
5'-c cac ttc tct ttt tcc ggt	10
5'-c cac tct tct ttt tcc ggt	
5'-c cac tct tct ttt ccc ggt	
5'-cac aca atc gta aca tcc ta	15
5'-agg gat gaa ctt tcc act c	
5'-cca ctc att ttc ttc cgg	20
5'-ccc ccg ctt gag ggc agg	
5'-cct ctt ttc ccg gtg gag	
5'-cct ctt ttt ccg gtg gag c	25
5'-cac tcc tct ttt cca atg a	
5'-cac tcc tct tac ttg gtg	30
5'-tag gtg cca gtc aaa ttt tg	
5'-ccc ctt ctg atg ggc agg	
5'-ccc cct ctg atg ggc agg	35
5'-cga ctt cgc aac tcg ttg	
5'-cga ctt cgc gac tcg ttg	40
5'-cga gtt cgc aac tcg ttg.	

und das Oligonukleotid zum Nachweis von Fäkalstreptokokken dient.

13. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das Oligonukleotid ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus

45

50

55

60

65

5' gac ccc ctt gcc gaa a

5' atg acc ccc tag ccg aaa

5' - ggc aca acc tcc aag tcg ac

5' - gga caa cca gcc tac atg ct

5' - aca aga ctc cag cct gcc

5' - cag gcg gtc tat tta acg cgt t

5' - ggc aca acc tcc aaa tcg ac

5' - ggc cac aac ctc caa gta ga

5' - acc aca ctc cag cct gcc

5' - aca aga ctc tag cct gcc

5' - ggc ggt cga ttt aac gcg tt

5' - ggc ggt cta ctt aac gcg tt

5' - ggc ggt cta ttt aat gcg tt

5' - agc tcc gga agc cac tcc tca

5' - gga aca acc tcc aag tcg

5' - gcc aca acc tcc aag tag

5' - atg gcc ccc tag ccg aaa

5' - g atg acc ccc tag ccg aaa

5' - aac ctt gcg gcc gta ctc cc

und das Oligonukleotid zum gleichzeitigen spezifischen Nachweis von coliformen Bakterien und Bakterien der Spezies *Escherichia coli* dient.

14. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 2 bis 9, enthaltend mindestens ein Oligonukleotid, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- i. en Oligonukleotiden nach Anspruch 1,
- ii. Oligonukleotiden, die mit den Oligonukleotiden nach Anspruch 1 in mindestens 60%, vorzugsweise mindestens 80% und besonders bevorzugt mindestens 90, 92, 94, 96%, übereinstimmen und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen,
- iii. Oligonukleotiden, die sich von den Oligonukleotiden nach Anspruch 1 durch eine Deletion und/oder Addition unterscheiden und eine spezifische Hybridisierung mit Nukleinsäuresequenzen von trinkwasserrelevanten Bakterienzellen ermöglichen, und
- iv. Oligonukleotiden, die mit den vorgenannten Oligonukleotiden unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

15. Kit nach Anspruch 14, in dem das mindestens eine Oligonukleotid in einer Hybridisierungslösung enthalten ist.

16. Kit nach Anspruch 14 oder 15, weiter enthaltend eine Waschlösung und ggf. eine oder mehrere Fixierungslösungen.